

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-303485

(43)Date of publication of application : 21.11.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A61K 31/70

A61K 31/70

C07H 21/04

(21)Application number : 06-124609

(71)Applicant : TONEN CORP

(22)Date of filing : 13.05.1994

(72)Inventor : FUNAHASHI SHINICHI
HASEGAWA AKIRA**(54) HCV ANTI-SENSE RNA, MANIFESTATION VECTOR CONTAINING THE SAME, AND THERAPEUTIC AGENT FOR HCV-INVOLVED DISEASE CONTAINING THE RNA OR MANIFESTATION VECTOR**

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new RNA having anti-sense activity of hepatitis C virus (HCV) genome to 5'-nontranslational region, inhibiting in vivo HCV proliferation through suppressing the manifestation of HCV's structural protein, thus useful as e.g. a therapeutic agent for HCV-involved diseases.

CONSTITUTION: This new HCV anti-sense RNA has a nucleotide sequence of formula I, II, III, IV, V or VI, having anti-sense activity of HCV genome to a fractional sequence of 5'-non-translational region and inhibiting in vivo proliferation of HCV through suppressing the manifestation of HCV's structural gene, thus being useful as a therapeutic agent for HCV-involved diseases such as hepatitis, hepatocirrhosis and hepatoma. This anti-sense RNA is obtained by transfer reaction, using a RNA polymerase, of a template DNA, the aimed amplified nucleotide sequence produced by polymerase chain reaction using a set of primers suitable for obtaining the aimed nucleotide sequence complementary to the fractional sequence of HCV's 5'-non-translational region.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.04.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 03.02.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision 2004-04198
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's 03.03.2004
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-303485

(43) 公開日 平成7年(1995)11月21日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
A 6 1 K 31/70	A C S			
	A D Y			
C 0 7 H 21/04	Z	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求	請求項の数5 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平6-124609

(22) 出願日 平成6年(1994)5月13日

(71) 出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(72) 発明者 舟橋 真一

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1

号 東燃株式会社総合研究所内

(72) 発明者 長谷川 明

埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目3番1

号 東燃株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 久保田 耕平 (外3名)

(54) 【発明の名称】 HCVアンチセンスRNA、それを含む発現ベクター、及び該RNA又は発現ベクターを含むHCV関連疾患治療剤

(57) 【要約】

【構成】 C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムの5' 非翻訳領域の部分配列に対するアンチセンスRNA、このRNAを発現可能なように保有する発現ベクター、及びこのRNA又はベクターを含むHCV関連疾患治療剤。

【効果】 C型肝炎ウイルスの構造蛋白質の発現を抑制することにより、生体内でのHCVの増殖を阻害する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムの5' 非翻訳領域の部分配列に対するアンチセンスRNA。

【請求項2】 配列番号1、2、3、4、5及び6に示されるヌクレオチド配列からなる群から選択される、C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムの5' 非翻訳領域の部分配列に対するアンチセンスRNA。

【請求項3】 請求項1又は2記載のアンチセンスRNAを発現可能なように保有する発現ベクター。

【請求項4】 請求項1又は2記載のアンチセンスRNAを有効成分として含有してなるHCV関連疾患治療剤。

【請求項5】 請求項3記載の発現ベクターを有効成分として含有してなるHCV関連疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノムの5' 非翻訳領域の部分配列に対するアンチセンスRNA、該RNAを保有する発現ベクター、及び該RNA又は発現ベクターを含むHCV関連疾患治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ある遺伝子に対して相補的な遺伝子を用いて該遺伝子の転写制御あるいは翻訳開始を妨害する、いわゆるアンチセンス医薬品はアンチセンスDNA、アンチセンスRNAを用いた研究が幾つかなされている (総説として *Biotechniques* 6, p.958-976 (1988) 及び *TIBTECH* 10, p.152-158 (1992))。アンチセンスDNAについては、例えばHIVのRRE (Rev responsive element) について相補的な oligodeoxynucleotide phosphorothioate (S-ODN) は Rev活性を阻害し、in vitroでは治療薬としての効果が示されている (Ge Li ら *Journal of Virology* 67, p.6882-6888 (1993))。アンチセンス医薬は一般には化学合成により数十塩基のオリゴヌクレオチドを作成し、それを適当な DDS (drug delivery system) により体内に運び入れ、特定な遺伝子の発現を制御することにより治療するというものである。導入する遺伝子の安定性を高める為に幾つかの誘導体が試みられているが、一般的には効果は一時的であり、頻繁に投与を必要とする。DDSについてはリポソームを用いる方法が試みられているものの、そのアンチセンス医薬の導入効率や組織特異性を高める方法についてはまだ多くの問題を抱えている。アンチセンスRNAは標的とする遺伝子の mRNAと相補的に符合することにより翻訳過程を阻害するが、これはアンチセンスDNAによるDNA-RNAよりもRNA-RNAの方が結合が強いのでより特異的な阻害が期待できる。しかしながら、RNAは分解されやすく、取り扱いが難しい。そこで、レトロウイルスベクターに組み込んで細胞に導入する方法が考案された (Nishikura, K. and

J. Murray, *Molecular and Cellular Biology* 7, p.639-649 (1987))。レトロウイルスベクターについては感染効率が低い、導入遺伝子が感染先の細胞の染色体へのランダムな部位に組み込まれてしまう危険性、分裂細胞にしか遺伝子を導入することができない等の問題点があり、アンチセンスRNAをレトロウイルスベクターによって導入できるのは骨髄細胞等限られた細胞、組織にしか適用することができない。また、直接体内に投与することはできず、採取した細胞にレトロウイルスベクターを導入し、増殖させた後に体内に戻すという操作 (ex vivo 投与) が必要であり、その間に病原菌等に汚染する恐れもあり、患者からの細胞採取から体内に戻すまでの時間と労力が必要となる。

【0003】

【発明が解決しようとする問題点】C型肝炎ウイルス感染者に対する有効な治療法は現在インターフェロン投与以外にはない。しかしながら、この治療法においてはC型肝炎ウイルスの二つのグループ、すなわちグループI、グループIIにおいて効果に差があり、すべてのC型肝炎ウイルス感染症に適用できるものではない。最近、金井ら (Kanai, K. et al.: *Lancet* 339, p.1543 (1992)) 及び吉岡ら (Yoshioka, K. et al.: *Hepatology* 16, p.293-299 (1992)) はPCR法により遺伝子型を分類し、それらがインターフェロン治療に対して異なる反応を示すことを報告している。小原 (日本臨床 51 巻 2 号 p.86-91) は慢性肝炎患者についてグループ分類と治療効果について検討している。グループI・C型肝炎ウイルス感染者では著効例 (ALT正常値が6ヶ月以上持続したもの) が11%しかなかったのに対して、グループII・C型肝炎ウイルス感染者は87%が著効を示し、残りの13%も有効 (一時的にALT値が正常化したもの) であり、無効例は認められなかったと報告している。グループI・C型肝炎ウイルス感染者では有効例50%、無効例39%であり、PCR法により血液中のウイルス量を定量した結果、ウイルス量が低い方が有効である傾向が認められた。

【0004】そこで、高いウイルス量が血液中に排出されている患者の場合にはそのウイルス量を下げたためになんらかの処置が必要である。

【0005】

【問題点を解決するための手段】本発明は一時的にC型肝炎ウイルス感染者のウイルス量を抑制することによりインターフェロン療法等の治療がより効果的に行えるような補完的な治療法として考案されたものである。具体的には、ウイルスベクター等の適切なベクターに、C型肝炎ウイルスの5' 端に存在する非翻訳領域 (5' UTR) の部分領域をアンチセンスRNAとして組み込み、適当なプロモーターの制御のもとにin vivo発現させることにより、C型肝炎ウイルスの構造蛋白質の発現を抑制、即ち該ウイルスの複製を抑制するものである。

【0006】本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）ゲノムの5' 非翻訳領域の部分配列に対するアンチセンスRNAを提供する。例えば、そのようなアンチセンスRNAは配列番号1、2、3、4、5及び6に示されるヌクレオチド配列からなる群から選択される。

【0007】特定のアンチセンスRNAは、それぞれRNA-AS1'、RNA-AS3、RNA-AS3'、RNA-AS5、RNA-RS6及びRNA-AS15と称され、図1に示されるHCV5' UTRのヌクレオチド配列の部分配列に相補的であり、且つ逆向きの配列を有する。図1中、RNA-AS1'はHCV5' UTRの位置78～215に相補的な配列（AS1'と称する）に、RNA-AS3はHCV5' UTRの位置101～170に相補的な配列（AS3と称する）に、RNA-AS3'はHCV5' UTRの位置101～240に相補的な配列（AS3'と称する）に、RNA-AS5はHCV5' UTRの位置131～200に相補的な配列（AS5と称する）に、RNA-AS6はHCV5' UTRの位置163～231に相補的な配列（AS6と称する）に、及びRNA-AS15はHCV5' UTRの位置122～308に相補的な配列（AS15と称する）にそれぞれ逆向きの配向をもって対応している。

【0008】本発明のアンチセンスRNAは、HCVの5' UTRを含むクローン、例えばクローン2-1（Tsukiyama-Koharaら、Journal of Virology: 66, p.1476-1483(1992)）を用い、且つ、HCV5' UTRの部分配列に相補的な目的のヌクレオチド配列（例えば、AS1、AS1'、AS3、AS3'、AS5、AS6、AS15等）を得るのに適するセットのプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（例えば、H. A. Erlich編、PCR Technology, Stockton Press, 1989）を実施して得られる増幅された該目的ヌクレオチド配列を鋳型DNAとして、RNAポリメラーゼによる転写反応を介して調製することができる。さらに、得られたアンチセンスRNAをゲル電気泳動等の公知の方法で精製する。これらの調製法については、後述の実施例に詳細に説明されており、これを参照されたい。

【0009】本発明のアンチセンスRNAは、HCVの5' UTRと構造領域（例えば、コア遺伝子領域、E1遺伝子領域、NS1遺伝子領域）を含むプラスミド（例えば、プラスミドpKIV（Tsukiyama-Koharaら、Journal of Virology 66, p.1476-1483(1992)）を制限酵素処理して得られるDNAを鋳型として合成したRNAをmRNAとするin vitro翻訳実験等において、HCV構造蛋白質の強い翻訳阻害を生じさせることが判明した。すなわち、本発明のアンチセンスRNAは、生体内でのHCV構造蛋白質の発現を有意に低減することが可能であり、それ故、生体内でのHCVの増殖を抑制するのに有用である。

【0010】したがって、本発明はさらに、上記アンチセンスRNAを有効成分として含有してなるHCV関連疾患治療剤を提供する。

【0011】本明細書中、「HCV関連疾患」とは、HCVが原因で引き起こされる肝炎、肝硬変、肝癌等の疾患を意味する。

【0012】RNAは一般に生体内で分解され易いため、例えばリボソーム等の医薬上許可能な物質中に封入することによって安定的に投与することもできる。例えば、静電荷多重膜リボソームは細胞毒性が低いことが知られており（八木ら、BBRC196, p.1042-1048 (1993)）、アンチセンスRNA又は後述のアンチセンス遺伝子発現ベクターを封入することにより、遺伝子を導入することも可能である。

【0013】したがって、本発明は、リボソーム内に封入されたアンチセンスRNAを有効成分として含有してなるHCV関連疾患治療剤にも関する。

【0014】あるいは、操作可能なプロモーターをもつ発現ベクターにアンチセンスRNAを組み込むことにより、生体内で該RNA遺伝子を発現させることが可能である。ベクターとしては、ウイルスベクターが好ましく、アデノウイルスベクターがより好ましい。アデノウイルスベクターは一般に効率よく非分裂細胞に感染し、多量の遺伝子産物を産生することができ、目的遺伝子の発現は数週間から数ヵ月と持続の長い一時的発現を提供し、レトロウイルスと異なって積極的な染色体への組み込みの機構を持たないため、宿主細胞の正常な遺伝子の働きを妨害しないなどの利点をもつ。さらに、in vivo投与が可能であり、内視鏡を用いるなどして直接特定の組織、細胞に導入することが可能である。

【0015】したがって、本発明はまた、アンチセンスRNAを発現可能なように保有する発現ベクターを提供する。また、該発現ベクターを有効成分として含有してなるHCV関連疾患治療剤をも提供する。

【0016】ここで、「発現可能なように」とは、生体内でアンチセンスRNAが発現され得ることを意味し、そのために操作可能なプロモーターがベクター中に含まれる。

【0017】発現に用いるプロモーターとしては、プロモーター活性の強いCAGプロモーター（Niwaら、Gene 108, p.193-200 (1991)）、EF-1αプロモーター（Kimら、Gene 91, p.217-223 (1990)）、SRαプロモーター（Takebeら、Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)）、RSV LTRプロモーター（Cullen Methods Enzymol. 152, p.684-704 (1987)）、CMV immediate earlyプロモーター（Seed and Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)）、SV40 earlyプロモーター（Rigby In Williamson (Ed.), Genetic Engineering, Vol. 3, Academic Press, London, p.83-141 (1982)）、SV40 lateプロモーター（Ch

eysen and Fiers, J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), アデノウイルス late プロモーター (Kaufman ら, Mol. Cell. Biol. 9, p.946(1989)), 単純ヘルペス TK プロモーター、ヒト血清アルブミンプロモーター、 α フェトプロテインプロモーター (Gutierrez ら, Lancet 339, p.715-721 (1992)) 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

【0018】本発明の発現ベクター、特に組換えウイルスの製法については、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4「動物細胞への遺伝子導入と発現・解析」羊土社 (1993年) に斉藤らが詳細に記載しており、これを参照することにより目的の組換えウイルスを作製することが可能である。

【0019】遺伝子を体内に導入する方法としては、組換えウイルスを用いる場合、例えばアンチセンス遺伝子を発現させる方法や、センダイウイルスとリボソームの融合体 (virosome) を利用する方法 (中西ら、第113回日本薬学会 (1993))、金属微粒子上にアンチセンス遺伝子をコーティングして高速で細胞に打ち込む、いわゆる遺伝子銃 (gene gun) による方法 (T.M. Klein ら, Bio/Technology 10, p.286-291 (1992)) が用いられる。

【0020】また医薬の製剤化に際しては、本発明のアンチセンスRNA又は発現ベクターを、医薬上許容可能な担体又は希釈剤と混合して製剤を得ることができる。また、本発明の治療剤中には、必要により肝炎、肝硬変及び肝癌等の公知の治療剤を含有させることも可能である。

【0021】投与量としては、*in vivo*でのHCVの複製を抑制できる量であり特に限定されないが、好ましくはアンチセンスRNAの場合には1 pg/kg (体重)/Day~1 g/kg/Day、好ましくは、1 μ g/kg/Day~1 mg/kg/Day、組換えウイルスベクターの場合には 10^6 ~ 10^8 PFU が適当である。

【0022】投与方法としてはカテーテルなど物理的な手段を用いて直接肝臓に遺伝子導入を行う方法が考えられるが、さらに肝臓特異的に遺伝子導入を行うためにはB. Goudら (Virology: 163, p.251-254 (1988)) トランスフェリンに対する抗体とウイルスベクターをカップリングさせる方法や、ウイルスエンベロープ糖蛋白質をアシアル化する方法により肝細胞特異的に存在するアシアロ糖蛋白質受容体との結合を利用する方法 (B. Salmonsらの総説 Human Gene Therapy: 4, p.129-141 (1993)) を用いてもよい。

【0023】毒性については、例えばアデノウイルスをベクターとして用いる場合、すでにアデノウイルスがワクチンとして用いられている経緯からもワクチン株を親株として用いる場合には細胞毒性はないと考えてよい。アデノ関連ウイルスはヒト染色体19qに組み込まれることが知られているが、細胞毒性はないとされている。

リボソームを利用する方法は、すでに米国において臨床応用されているが前述のウイルスをベクターとして用いる方法よりもさらに細胞毒性は低いことが期待される。

【0024】

【実施例】

実施例1 アンチセンスRNAの合成

1. オリゴヌクレオチドの合成

C型肝炎ウイルス (HCV) の5' UTRの一部を含むオリゴヌクレオチド16種類を β アミダイト法を用いてDNA合成機 Cyclone™ Plus Synthesizer (日本ミリポア社製) により合成した。合成したオリゴヌクレオチドは以下の配列を有する。

【0025】

【表1】

AS15	5'	-cggggtaccttccgcagaccacta-	3'
AS13	5'	-ccggaattcggcgtagtatgagt-	3'
AS1' 5	5'	-cggggtaccttccaggcattgag-	3'
AS35	5'	-cggggtacctggcaattccggtgt-	3'
AS33	5'	-taggaattcgctccaggaccccc-	3'
AS3' 5	5'	-ataggtaccagtcttgcggggca-	3'
AS55	5'	-cggggtaccgggtaataccaagaa-	3'
AS53	5'	-ccggaattcatagtggtctcgga-	3'
AS65	5'	-tatgtaccgggggcacgccaaa-	3'
AS63	5'	-ccggaattcaattgccaggacgac-	3'
AS153	5'	-gggagagccatagtggtctg-	3'

2. テンプレート DNAの調製

HCVの5' UTRを含んだプラスミドクローン2-1を用い、以下の条件により遺伝子増幅を行った。

【0026】

【表2】

60 μ l	蒸留水
10 μ l	10×Pfu バッファー#2
	(200mM Tris-HCl (pH8.2), 100mM KCl, 60mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15mM MgCl ₂ , 1% Triton X-100)
1 μ l	クローン2-1 DNA (0.1 mg/ μ l)
10 μ l	プライマー A (10 pmol/ μ l)
10 μ l	プライマー B (10 pmol/ μ l)
8 μ l	dNTP 混合液 (10 mM)
1 μ l	Pfu DNA ポリメラーゼ (2.5units/ μ l) (Stratagene社製、カタログ#600135)
計100 μ l を0.5 ml アシストチューブに入れ、ピペッティングにより混合後、ミネラルオイル (シグマ社製、カタログ#M5904) を上層した後、94℃ 5分、45℃ 5分、72℃ 2分保温後、94℃ 1分、45℃ 1分、72℃ 1分の反応を30回繰り返す、最後に72℃ 7分の反応を行った。プライマー A, プライマーB の組み合わせ及び得られた反応物の呼称については以下の通りである。	

【0027】

【表3】

プライマー A	プライマー B	反応物
AS15	AS13	AS1
AS1' 5	AS13	AS1'
AS35	AS33	AS3
AS3' 5	AS33	AS3'
AS55	AS53	AS5
AS65	AS63	AS6

反応物は -80℃ 10 分間放置後、室温に戻し融解してきたミネラルオイルを除去し、エタ沈メート（和光純薬社製）1 μl、3 M酢酸ナトリウム液（和光純薬社製）3 μl、エタノール 220 μl を加えよく混合した後、室温で15000 回転15分間の遠心操作の後、沈殿物として回収した。70 μl TE (10mM Tris-HCl, 1mMEDTA pH 8.0) に溶解し、45 μl を以下の条件により制限酵素による切断を行った。反応液 (200mM Tris-acetate, 100mM magnesium acetate, 500mM potassium acetate, 10mM DTT (pH 7.9 at 25℃)) を 5 μl 添加し、各20ユニットの制限酵素 EcoRI, KpnIをさらに加えた後、37℃にて 6時間反応させた。これを4% Nusieve™ GTG Agarose (宝酒造社製) ゲル電気泳動により分離し、目的の長さの反応物のみをゲルから切り出し、BIO 101 社製の MERMAID™ kit を用いて DNAを回収した。方法はキット添付のマニュアルに従い、最終産物として 20 μl の DNA溶液が得られた。得られた DNAは制限酵素 EcoRI, KpnIにて上記条件と同じように消化した pBluescript® II SK(-) 50 ngとともに宝酒造社製DNA Ligation kitを用いてプロトコ

ルに従って連結反応を16℃ 30 分間行った。75 μl の反応液中 1 μl を用いて再び前記と同様な条件にて遺伝子増幅反応を行った。但し、プライマーA はすべてM13 Sequencing primer M4(5' -gttttccagtcacgac-3') (10pmol/μl) (宝酒造社製) を用い、プライマーB は連結反応に用いた反応物を得るための最初の遺伝子増幅に用いたプライマーとそれぞれ同じものを用いた。これらの反応から得られた産物はバクテリオファージT7のプロモーターの下流に最初の遺伝子増幅で得られた DNAが連結した形となる。これらを前記と同様な操作によりアガロースゲル電気泳動後、MERMAID™ kitを用いて目的の DNA断片を回収した。最初の遺伝子増幅で得られた DNA、今回の遺伝子増幅で得られた DNAそれぞれの呼称と断片の長さ及び T7 RNA ポリメラーゼを用いたin vitro翻訳により得られる転写体 (RNA 産物) の長さについては以下のようになる。

【0028】

【表4】

最初の産物	2回目の産物	DNA の長さ	RNA の長さ
AS1	T7-AS1	157bp	94base
AS1'	T7-AS1'	226bp	163base
AS3	T7-AS3	158bp	95base
AS3'	T7-AS3'	227bp	164base
AS5	T7-AS5	158bp	95base
AS6	T7-AS6	158bp	95base

2回目の産物についてはミネラルオイルを前記と同様な操作により除去した後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、反応液の 1/10の容積の 5M 酢酸ナトリウム溶液と 2容積のエタノールを加えて、-20℃ 30 分間放置後、15000 回転15分間の遠心操作により DNAを回収し、30 μl の RNase-free の蒸留水に溶かした。RNase-free の蒸留水は最終濃度が 0.05%となるようにジエチルピロカルボネート (DEPC) (Sigma社製) を蒸留水に添加後、37℃にて一晚放置した後に 120℃45 分間オートクレーブすることによって調製した。得られた2回目の産物の濃度は 20 μg/mlでそれぞれ 7 μl (0.5 pmole から 1.4 pmoleに相当) を invitro 翻訳のテンプレート DNAとして用いた。

【0029】クローン2-1 DNA 5 μg を10×SmaIバッファー (100mM Tris-HCl (pH8.0), 70mM MgCl₂, 70mM 2-メルカプトエタノール, 200mM KCl, 0.1% BSA) 5 μl と蒸留水を加えて、50 μl として制限酵素 SmaI 20 u

nitsとともに37℃ 6時間保温して消化した後、4% Nusieve™ GTGアガロースゲルで分離し、187 bpの SmaI 断片をゲルから切り出し、MERMAID™ kitを用いた前述と同様の操作により DNAを回収した。pBluescript II SK(-) 3 μg を10×H バッファー (500mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM MgCl₂, 10mM Dithiothreitol, 1000mM NaCl) 5 μl と蒸留水を加えて50 μl とし、20 unitsの制限酵素 HincII で消化したもの 50ng とともに宝酒造社製 DNA Ligation kit を用いて16℃ 30 分間保温して連結反応を行い、M13 sequencing primer M4, M13 Reverse primer RV それぞれ 100pmolと共に遺伝子増幅を行い、438 bpの産物が得られた。これをさらに、M13 sequencing primer M4, AS153 それぞれ 100pmolとともに遺伝子増幅し、T7-AS15 を得た。同様な操作により in vitro 翻訳のテンプレート DNAとした。図1、表5にアンチセンス RNA として用いた領域を示す。

【0030】

【表5】

NAME	primer A	primer B	Region (HCV 5'UTR)	5' additive	3' additive	RNA length
T7-AS1	M4	AS13	148~78	14	9	94
T7-AS1'	M4	AS13	216~78	15	9	163
T7-AS3	M4	AS33	172~101	14	9	95
T7-AS3'	M4	AS33	240~101	15	9	164
T7-AS5	M4	AS53	201~130	15	8	95
T7-AS6	M4	AS63	233~163	15	9	95
T7-AS15	M4	AS153	308~122	34	0	221

表5には、in vitro 翻訳に用いるテンプレートDNAを遺伝子増幅により作成した際に用いたプライマーの種類、テンプレートDNAに含まれているC型肝炎ウイルスの5' UTRの領域、ベクター由来で5'端、3'端に付加された領域の長さ、T7 RNAポリメラーゼにより合成されるRNA産物の長さを示す。塩基番号は図1による。

【0031】3. アンチセンスRNAの合成

アンチセンスRNAはAmbion社製のin vitro transcription kit (MEGAscript™ T7 kit、カタログ#1334)を用いて作製した。以下に反応条件を示す。

【0032】

【表6】

2 μl	10x Transcription buffer (キット添付)
2 μl	75mM ATP Solution (キット添付)
2 μl	75mM CTP Solution (キット添付)
2 μl	75mM GTP Solution (キット添付)
2 μl	75mM UTP Solution (キット添付)
7 μl	テンプレートDNA
2 μl	Enzyme Mix (キット添付)
1 μl	cloned T7 RNA polymerase (200 units/μl)
(Ambion社製、カタログ#2085)	

2 μl の RNA サンプルに対して 2 μl の Loading buffer (キット添付) を加え、95℃ 3分間保温した後、1 mg / ml エチジウムブロマイド (EtBr) 1 μl を加えて 8M 尿素 / 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、正しい長さの RNA が合成されたことを確認した。

【0034】実施例2 In vitro 翻訳実験

1. mRNAの調製

HCV の 5' UTR、コア遺伝子領域、E1遺伝子領域、NS1 遺伝子領域 (塩基番号9番から1772番) を含むプラスミド pKIV (小原ら、Journal of Virology, 66, p.1476-1483 (1992)) は T7 プロモーターの下流に HCV の前記遺伝子領域が挿入されており、T7 RNAポリメラーゼによ

計 20 μl の反応液を 0.5 ml アシストチューブに分注し、37℃保温器にて6時間保温した。各サンプルに対して 1 μl の RNase-free DNase I (キット添付) を加えて、37℃にて15分間反応させてテンプレートDNAを分解した後、115 μl の RNase-free 蒸留水と 15 μl の Ammonium acetate Stop Solution (キット添付) をよく混合し、さらにフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出にて蛋白質を除去した。150 μl のイソプロパノールを加え、よく混合した後に -20℃ 30分間放置し、15000 回転 15 分間の遠心操作により RNA を沈殿させた。70% エタノールにて沈殿物を洗浄した後、20 μl の RNase-free 蒸留水に溶かした。各 RNA 産物の濃度と純度を以下に示す。RNA 濃度は 260nm の吸光度 1.0 を 35 μg / ml として計算し、純度については 260nm と 280nm の吸光度の比により 1.7 から 2.1 の間であることが純粋な RNA であることが一般に知られている。得られた RNA は概ね 1.8 付近であり純度について問題はないものであった。

【0033】

【表7】

RNA	RNA 濃度	RNA 純度 (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)
AS1-RNA	5.57 mg / ml	1.84
AS1'-RNA	6.07 mg / ml	1.84
AS3-RNA	5.62 mg / ml	1.84
AS3'-RNA	5.72 mg / ml	1.85
AS5-RNA	5.48 mg / ml	1.79
AS6-RNA	5.09 mg / ml	1.87
AS15-RNA	8.16 mg / ml	1.83

り人工的に RNA を合成することができる。制限酵素 Sal I にて以下の条件にてプラスミド DNA 10 μg を消化した。

【0035】

【表8】

25 μl	10xH バッファー (500mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM MgCl ₂ , 10mM Dithiothreitol, 1000mM NaCl)
220 μl	DNA 溶液
5 μl	制限酵素 Sal I (6units/μl)
計 250 μl を 1.5 ml アシストチューブに分注し、37℃にて 4 時間反応させた。完全に消化されて DNA が直鎖状と	

なったことをアガロースゲル電気泳動にて確認した後、
13 μ l の 10% SDS、2.6 μ l の Proteinase K (20 mg/
ml) (Stratagene社製、カタログ#300140) を加えて制
限酵素及び DNA回収の際に微量に含まれている RNaseを
37 $^{\circ}$ C 1時間の反応にて分解した。フェノール/クロロ
ホルム抽出により Proteinase K を除去し、26.5 μ l の
5M 酢酸ナトリウム溶液、530 μ l のエタノールを加え
てよく混合し、-20 $^{\circ}$ C にて 30 分間放置後、15000 回転
15分間の遠心操作により DNAを沈殿物として回収した。
70% エタノールにて洗浄後、30 μ l の RNase-free 蒸留
水に溶解させた。DNA の濃度はともに0.2 mg/mlであ
り、8 μ l (0.5 pmoleに相当) を DNAテンプレートとし
て前述と同様な操作によりMEGAscriptTM kitを用いて R
NAを合成した。得られた RNAは mRNA としてさらに in
vitro 翻訳 (translation) により蛋白質への翻訳を行
わせた。RNA 合成は以下の条件により行った。

【0036】

【表9】

2 μ l	10 \times Transcription Buffer
	RNA
	mRNA-KIV
	RNA 濃度
	7.25 mg / ml

得られた RNAはホルムアルデヒド法による電気泳動によ
り確認した。方法を以下に示す。0.8 g のSeakemTM GTG
agarose (宝酒造社製) に 73 mlの蒸留水を加え、加温
し、よくアガロースを溶かしてから、60 $^{\circ}$ Cにまで冷や
す。10 \times Gel Running Buffer (0.2M MOPS (pH7.0), 50m
M 酢酸ナトリウム、5mM EDTA(pH8.0)) 10 mlと37% ホル
ムアルデヒド 16.2 mlをフード内で添加し、よく混ぜ合
わせてゲル作製台に流し込み、ゲルを作製する。泳動サ
ンプルの調製は以下のようにして行った。

【0038】

【表11】

3.5 μ l	RNA
2.0 μ l	10 \times Gel Running Buffer
3.5 μ l	ホルムアルデヒド
10.0 μ l	脱イオン化ホルムアミド
計19 μ l を 0.5 ml アシストチューブに分注し、68 $^{\circ}$ C 5 分間保温した後、1 mg/ml EtBr を 1 μ l 加え、68 $^{\circ}$ C 1 5 分間保温した後氷上に 5分間置く。2 μ l の Loading Buffer (50% glycerol, 1mM EDTA, 0.4% bromophenol blue, 0.4% xylene cyanol) を加え、前述の 0.8% アガ ロース/2.2Mホルムアルデヒドゲルにて50V で泳動し、 RNA が正しく合成されていることを確認した。	

【0039】2. In vitro翻訳実験

1.で調製した mRNA を用いて in vitro 翻訳を行った。
Stratagene社製の Invitro. ExpressTM translation kit
(カタログ#200360) を用いた。反応条件は添付のブ
ロトコールドに従い、以下のような手順で実験を行った。

【0040】1.5 μ g mRNA (約 2.5 pmole) を 0.5 ml
アシストチューブに分注し、RNase-free蒸留水を加えて

2 μ l	75mM ATP Solution
2 μ l	75mM CTP Solution
2 μ l	75mM GTP Solution
2 μ l	75mM UTP Solution
8 μ l	DNA テンプレート
2 μ l	Enzyme Mix

計 20 μ l の反応液を 0.5 ml アシストチューブに分注
し、37 $^{\circ}$ C 6時間保温した。反応後 1 μ l の RNase-free
DNase-I を加えて 37 $^{\circ}$ C 15 分間の保温によりテンプレ
ート DNAを分解した。30 μ l の RNase-free 蒸留水、25
10 μ l の LiCl Solution (キット添付) を加えて、-20 $^{\circ}$ C
30 分間放置後、4 $^{\circ}$ C にて15000 回転 15分間の遠心操
作により RNAを沈殿物として回収した。70% エタノール
にて沈殿物を洗浄した後、20 μ l の RNase-free 蒸留水
に溶解させた。得られた RNAの濃度、純度は以下のよう
な結果であった。

【0037】

【表10】

RNA 純度 (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)
1.7

5 μ l とし、68 $^{\circ}$ C 30秒間保温した後、上記キットの rab
bit reticulocyte lysate をすばやく融解させ、このう
ちの 20 μ l を mRNA の入ったチューブに加えて、穏や
かによく混合し、30 $^{\circ}$ C 1時間反応させた。反応終了後25
1 μ l の 2 \times SDS-PAGE buffer (0.125M Tris-HCl (pH6.
8), 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-メルカプトエタノール,
0.002% bromophenol blue)を加えて 5分間95 $^{\circ}$ Cに保
温し、15%-25 % SDS- ポリアクリルアミドゲルにより
30 分離した。泳動後のゲルは SDS入りのトランスファーバ
ッファー (48mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメ
タン、39mM グリシン、0.0375% SDS) にて PVDF 膜
(ImmobilonTM -P Transfer membranes : 日本ミリポア
社製) へ Sartorius社製の Sartoblot^R II-Sを用いて転
写した。転写は 300mA 30 分間で行った。ウェスタンブ
ロディングは蛋白質の転写されたPVDF膜を 5% スキム
ミルク (Difco社製)、2.5 %牛血清アルブミン (BSA)の
入った T-TBSバッファー (0.05% Tween80, 20mM Tris-H
Cl (pH7.5), 500mM NaCl) 中にて 1晩 4 $^{\circ}$ Cに置き、非特
異的な蛋白質の吸着を阻害した後、ウサギ抗 HCVコア蛋
白質抗血清を抗体希釈液 (1 %スキムミルク、0.5 % B
SA、T-TBS) にて 1000 倍に希釈した溶液中に室温で 1
時間反応させた。T-TBS にて洗浄後、ビオチン化した抗
ウサギ Ig 抗体 (アマシャム社製) を 1000 倍に抗体希
釈液にて希釈した溶液中に室温 1時間の反応を行っ
た。T-TBS による洗浄後、ストレプトアビジン標識ビオ
チン化ペルオキシダーゼ複合体 (アマシャム社製) を 5
000 倍に抗体希釈液にて希釈した溶液中に室温 15 分
間反応させた。T-TBS にてよく洗浄した後、アマシャム
社製の ECL detection kitを用いて HCVコア蛋白質の検

出を行い、22 Kd のバンドが検出された。

【0041】実施例3 アンチセンス RNAによる翻訳阻害実験

mRNAを *in vitro* にて翻訳させる際に HCV 5' UTR の領域の一部に対するアンチセンス RNA、RNA-AS1、RNA-AS1'、RNA-AS3、RNA-AS3'、RNA-AS5、RNA-AS6、RNA-AS15 の7種類をそれぞれ 1.5 μ g mRNAに対してモル比 1:100 となるように加えて総量 5 μ l とし、実施例2の2.と同様にして *in vitro* 翻訳を行った。15-25% SDS-PAGE にて分離後、PVDF膜に転写し、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、RNA-AS15、RNA-AS1'を添加したサンプルでは HCVコア蛋白質の 22Kd バンドの顕著な消長が見られ、強い翻訳阻害が生じていた。RNA-AS3'でも翻訳阻害が見られた(図2)。これら以外のアンチセンス RNAについてはさらに以下の実験を行った。

【0042】³⁵S ラベルの *in vitro* 翻訳実験

mRNA-KIVを用いて Amersham rabbit reticulocyte lysate (N150) による³⁵S-methionineラベルの *in vitro* 翻訳実験を行った。

【0043】反応液の組成は、下記に示す。

【0044】

【表12】

17.5 μ l	Amino acid-depleted lysate (Amersham N.150)
1.6 μ l	2M potassium acetate solution
1.25 μ l	1mM amino acid mixture minus L-methionine
0.5 μ l	1.25 pmol mRNA-KIV
2.15 μ l	125 pmol antisense RNA
2 μ l	³⁵ S-L-methionine (ICN 51001H; >1000 Ci/mmol)

総量 25 μ l にて、30℃ 1時間反応後、反応液 2 μ l を 98 μ l の 1N NaOH/2% H₂O₂ に加えて、37℃にて10分間反応させ、900 μ l の25% TCA (トリクロロ酢酸) / 2% カザミノ酸を添加して、氷上に30分間静置した。沈殿させた反応物をガラスフィルターにより濾過して、液体シンチレーターにより、その放射活性を測定して、翻訳阻害効果の比較とした。陰性コントロールとしてmRNA-KIVを添加しないで *in vitro* 翻訳を行い、その値をバックグラウンドとして各サンプルの値から差し引いた。mRNA-KIVのみを添加した

プライマー EcoAS153 5' -CGGAATTCGGGAGAGCCATAGTG-3'
 プライマー EcoAS155 5' -CGGAATTCGGGGCACTCGCAAGC-3'

得られたDNA断片は1 μ g を 10 \times EcoRI バッファー (1000mM Tris-HCl (pH7.5), 70mM MgCl₂, 70mM 2-メルカプトエタノール, 500mM NaCl, 0.1% BSA) 5 μ l と蒸留水、制限酵素EcoRI 10 units を加えて、50 μ l として37℃ 2時間保温して消化した後、4% Nusieve™ GTGアガロースゲルで分離し、197 bp のDNA断片をゲルから切り出し、MERMAID™ kitを用い

際の放射活性を1として、アンチセンスRNAを加えたことによる翻訳の阻害を相対比で示した。その結果、RNA-AS1を除きRNA-AS1'、RNA-AS3、RNA-AS3'、RNA-AS5、RNA-AS6のいずれにおいても翻訳阻害効果が見られた(表13)。

【0045】

【表13】

	count	ratio
no RNA-AS	19081.67	1.00
RNA-AS1	17245.00	0.90
RNA-AS1'	8398.53	0.44
RNA-AS3	10869.29	0.57
RNA-AS3'	14615.00	0.77
RNA-AS5	8949.12	0.47
RNA-AS6	8098.33	0.42

表13中、count は液体シンチレーションカウンターにより測定した値で、陰性コントロールとしてmRNA-KIVを添加しないで *in vitro* 翻訳を行った値をバックグラウンドとして各サンプルの値から差し引いた値を示し、単位はcpmである。アンチセンスRNAを添加しなかった値との相対比をさらに示した。

【0046】実施例4 組換えアデノウイルスの作製
 組換えアデノウイルスの作製方法については、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4「動物細胞への遺伝子導入と発現・解析」羊土社(1993年)に斉藤らが詳しい方法について述べており、それらの方法に従って行えば同業者であれば簡単に作製することができる。

【0047】アンチセンスRNA-AS15は発現させるためのベクターの製法について具体的に以下に述べるが、用いるプロモーターおよびアデノウイルスの種類についてはこれらに限らず、他のものを用いてもよい。

【0048】組換えアデノウイルスAS15の作製法
 クローン2-1 (Tsukiyama-Kohara et al. Journal of Virology: 66, p.1476-1483 (1992)) 0.1 μ g を以下の配列を有するプライマー各1.00 pmolとともにPfu polymeraseを用いて先に述べたような反応条件により遺伝子増幅を行い、両末端に制限酵素EcoRIによる認識部位を導入したDNA断片を得た。

【0049】

【表14】

た前述と同様の操作によりDNAを回収した。
 【0050】CAGプロモーターが組み込まれたベクターpCAGGS (Niwaら, Gene: 108, p.193-200. (1991)) 2 μ g を制限酵素EcoRIにて上記と同様な条件にて消化し、AS15の配列を有する先のDNA断片とともにDNA Ligationkit (宝酒造社製)を用いて連結反応を行い、CAGプロモーターの下流にEcoRI

認識部位を介して、配列6に示すAS15の配列が挿入されたベクターpCAG-AS15が作製できた。pCAG-AS15のDNA 5μgを10×Hバッファー5μlと蒸留水を加え、制限酵素SalI、HindIII各20 unitsを加えて、50μlとして37℃6時間保温して消化した後、宝酒造社製のDNABlunting kitを用いてプロトコールに従って、DNAの末端の平滑化を行った。

【0051】アデノウイルス発現コスミドカセットpAdex1w (斎藤ら、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4「動物細胞への遺伝子導入と発現・解析」羊土社(1993)) 5μgを制限酵素SwaI (ペーリンガー社製)にて10×Hバッファー5μlと蒸留水を加え、制限酵素SwaI 12 unitsを加えて、50μlとして25℃2時間保温して消化し、フェノール/クロロホルム抽出後、ファルマシア社製のG-25カラムを用いて精製した。SwaI消化のpAdex1w1μgと平滑末端化したDNA断片0.2μgをエタノール沈殿した後、5μlのTE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0))に懸濁し、0.7μl 10×Lバッファー、0.3μl 10mM ATP、1μl T4 DNA Ligaseとともに15℃にて一晩反応を行った。0.5μl 2M NaCl、4μl 10×Hバッファー、34μl蒸留水を加えて、70℃10分保温することでDNA Ligaseを熱失活させた。制限酵素SwaI 20 unitsを加え、25℃1時間の反応後、フェノール/クロロホルム抽出し、G-25カラムにて連結されたDNAを回収した。50μl DNA溶液をさらに6μl 10×Hバッファーと20 units SwaIを加えて再度25℃で2

配列

```
CUCCAGGCAU UGACGGGUU AAUCCAAGAA AGGACCCGGU CGUCCUGGCA AUUCCGGUGU 60
ACUCACCGGU UCCGACAGAC ACUCUGGCUC UCCCGGGAGG GGGGGUCCUG GAGGCUCCAC 120
GACACUCAUA CUAACGCC 138
```

配列番号: 2

配列の長さ: 70

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

```
UGGCAAUUCC GGUGUACUCA CCGGUUCCGC AGACCACUUAU GGCUCUCCCG GGAGGGGGGG 60
UCCUGGAGGC 70
```

配列番号: 3

配列の長さ: 140

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

```
CAGUCUCGCG GGGGCACGCC CAAAUUCUCA GGCAUUGAGC GGUUAAUCC AAGAAAGGAC 60
CCGGUCCGUCC UGGCAAUUCC GGUGUACUCA CCGGUUCCGC AGACCACUUAU GGCUCUCCCG 120
GGAGCCCGCG UCCUGGAGGC 140
```

配列番号: 4

配列の長さ: 70

時間消化した。このうち1μlをStratagene社製のGIGAPACK XLを用いて、プロトコールにある用法の1/4のスケールでパッケージングを行い、目的のコスミドpAdex-CAGAS15を得た。組換えアデノウイルスの作製については前述の斎藤ら記載の方法に従って行い、組換えアデノウイルスAd-CAGAS15を得た。

【0052】

【発明の効果】本発明はアンチセンスRNAを例えばリポソームに封入して又はウイルベクターに組み込んで直接炎症をおこしている肝臓に投与することにより、肝臓で増殖しているC型肝炎ウイルスの構造蛋白質の発現の制御を司っているC型肝炎ウイルス遺伝子の5' UTR (5'側に存在するC型肝炎ウイルスの非翻訳領域)に対して相補的に符合させて立体障害を伴う構造遺伝子発現制御領域の障害を誘導し、C型肝炎ウイルスの増殖を阻害して、C型肝炎ウイルス量を制限することでインターフェロンによるより効果的な治療を可能にするものである。

【0053】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 138

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

アンチセンス: Yes

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー：直鎖状

アンチセンス：Yes

配列の種類：他の核酸

配列

GGGUAAUCC AAGAAAGGAC CCGGUCGUCC UGGCAAUCC GGUGUACUCA CCGGUUCCGC 60
AGACCACUUA 70

配列番号：5

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：69

配列の種類：他の核酸

配列の型：核酸

アンチセンス：Yes

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGCACGC CCAAAUCCUCC AGGCAUUGAG CCGGUUAAUC CAAGAAAGGA CCCGGUCGUC 60
CUGGCAAUU 69

配列番号：6

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：186

配列の種類：他の核酸

配列の型：核酸

アンチセンス：Yes

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGCACUCG CAAGCACCCU AUCAGGCAGU ACCACAAGGC CUUUCGCGAC CCAACACUAC 60
UCGGCUAGCA GUCUCGCGGG GGCACGCCA AAUCCUCCAGG CAUUGAGCGG GUUAAUCCAA 120
GAAAGGACCC GGUCGUCCUG GCAAUCCCG GUACUCACCG GUUCCGCAGA CCACUAUGGC 180
UCUCCC 186

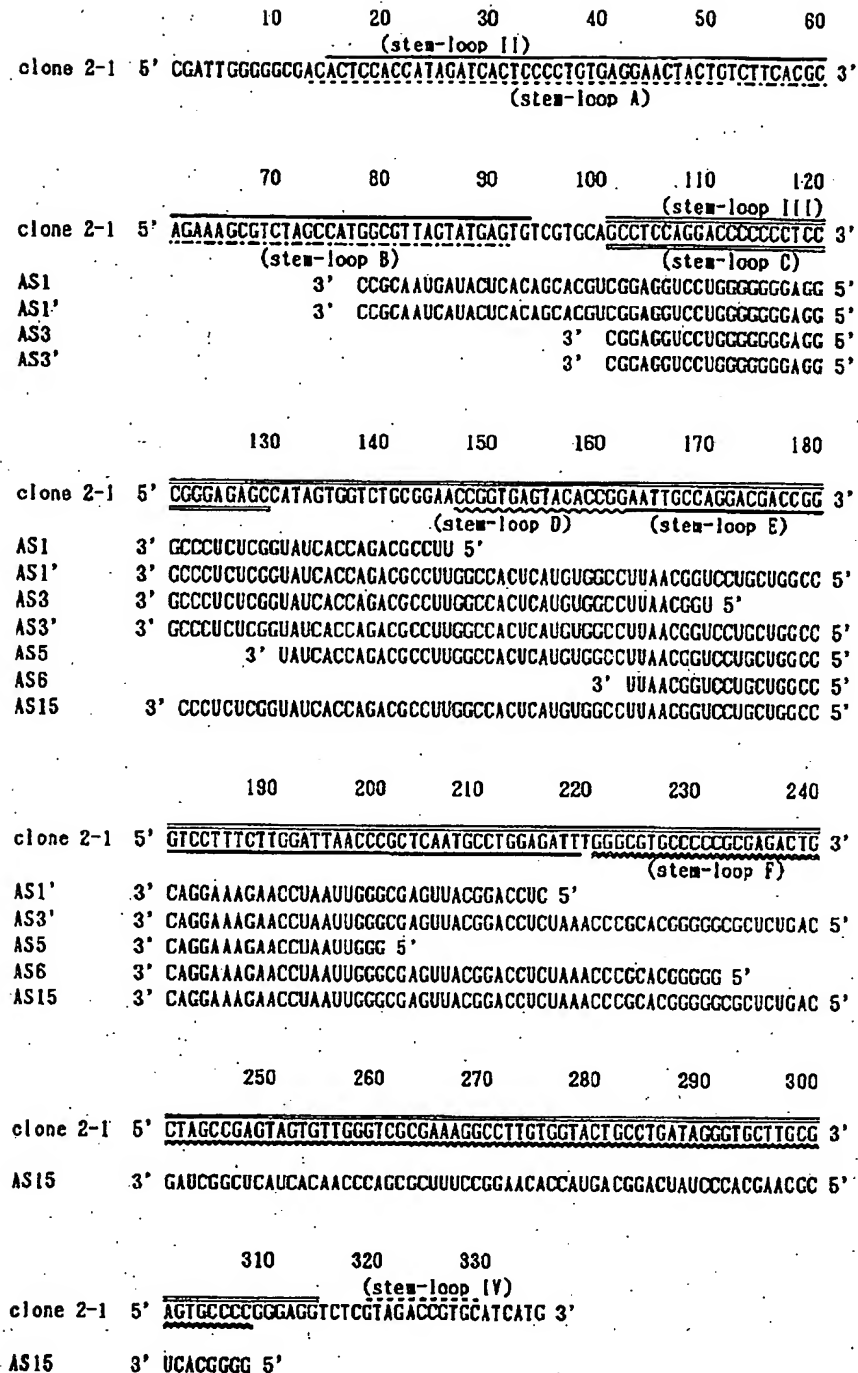
【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、C型肝炎ウイルス クローン2-1の5' UTRの配列とアンチセンスRNAの領域を示す。クローン2-1 5' UTRの配列の上部に示したstem-loop I, III, IVはBrown, E.ら(Nucleic Acids Research, 20, p.5041-5045 (1992))が報告しているC型肝炎ウイルス 5'UTRの二次構造予測による領域の分類であり、

配列下部に示したstem-loop A, B, C, D, E, FはTsukiyama-Kohara, K.ら(Journal of Virology, 66, p.1476-1483 (1992))による二次構造予測による分類である。

【図2】この図は、³⁵Sラベルのin vitro 翻訳実験の結果を示す、ウサギ抗core蛋白質ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出されるcore蛋白質のバンドを示す写真である。

【図1】



【図2】

